

(19)



(11)

**EP 3 591 400 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
**08.01.2020 Patentblatt 2020/02**

(51) Int Cl.:  
**G01N 33/543<sup>(2006.01)</sup> G01N 1/30<sup>(2006.01)</sup>**

(21) Anmeldenummer: **18181192.8**

(22) Anmeldetag: **02.07.2018**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**BA ME**  
Benannte Validierungsstaaten:  
**KH MA MD TN**

(71) Anmelder: **Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG**  
**23560 Lübeck (DE)**

(72) Erfinder:  
• **Eggert-Gospos, Dirk**  
**23847 Schürensöhlen (DE)**  
• **Rateike, Martin**  
**23689 Pansdorf (DE)**  
• **Stöcker, Winfried**  
**23627 Groß Grönau (DE)**  
• **Rottmann, Norbert**  
**23570 Lübeck (DE)**

### (54) BESCHICHTETE FESTPHASENFRAGMENTE UND DEREN HERSTELLUNG

(57) Die vorliegende Erfindung richtet sich auf ein Verfahren zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten, ein nach einem solchen Verfahren hergestelltes mit biologischem Material beschichtetes Festphasenfragment, ein Träger, auf dem mindestens ein erfindungsgemäßes Festphasen-

fragment aufgebracht ist und eine Vorrichtung zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten, die eine Zugspannungseinheit, eine Hebekopfseinheit und eine Entnahmeeinheit umfasst.

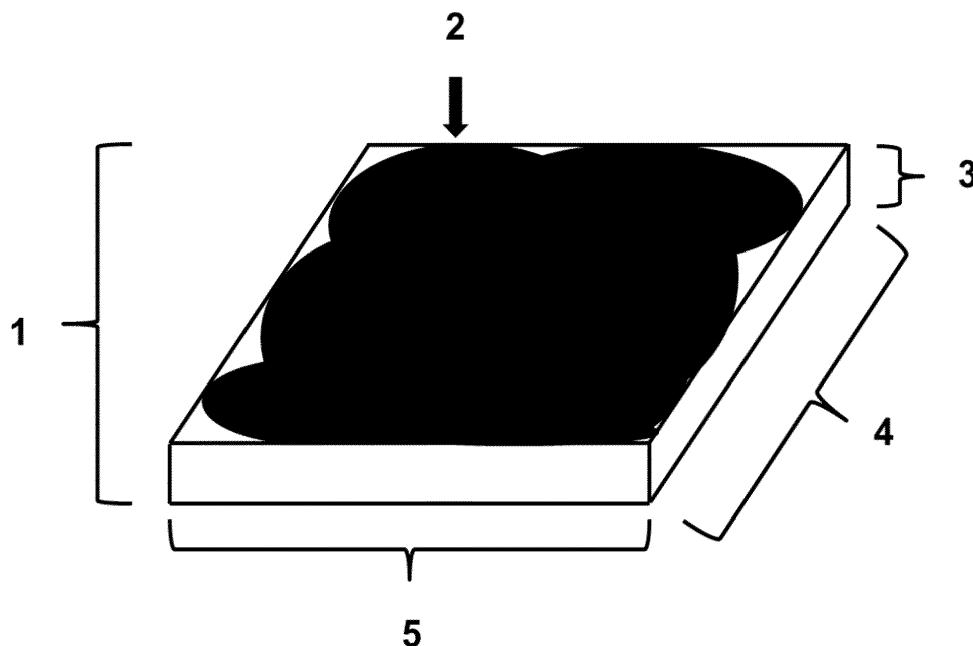


Fig. 1

EP 3 591 400 A1

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung richtet sich auf ein Verfahren zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten, ein nach einem solchen Verfahren hergestelltes mit biologischem Material beschichtetes Festphasenfragment, ein Träger, auf dem mindestens ein erfindungsgemäßes Festphasenfragment aufgebracht ist und eine Vorrichtung zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten, die eine Zugspannungseinheit, eine Hebekopfseinheit und eine Entnahmeeinheit umfasst.

**[0002]** Viele Testsysteme für die klinische und medizinische Diagnostik, Veterinärmedizin, pharmazeutische und toxikologische Untersuchungen, Lebensmittel- und Umweltanalytik sowie für allgemeinbiologische und biochemische Analysen basieren auf dem Einsatz Festphasen-gebundener Bioreagenzien (Festphasen-Tests). Ein klassisches Beispiel sind immunologische Testsysteme (Immunoassays), ohne die zahlreiche Bereiche der modernen Diagnostik und Analytik heutzutage nicht mehr vorstellbar sind. Ein Immunoassay ist eine Technik, bei der mittels einer immunologischen Reaktion die Anwesenheit einer Substanz gemessen wird. Charakteristisch für jede immunologische Reaktion ist eine Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen. Das Resultat dieser Wechselwirkung ist ein Antikörper-Antigen-Komplex. Durch *in vitro* Assays können der Antikörper oder das korrespondierende Antigen nachgewiesen werden. Der Nachweis des Antikörpers setzt die Zugabe des entsprechenden Antigens zum Testsystem voraus und umgekehrt. Antikörper (Immunglobuline) sind eine besondere Kategorie von Proteinen. Antigene können biologische oder organische Moleküle, aber auch andere chemische Verbindungen sein. Die meisten Immunoassays verlangen eine Trennung von gebundenem und freiem Antikörper und Antigen (heterogene Immunoassays oder Festphasen-Immunoassays). Diese Trennung wird dadurch bewerkstelligt, dass ein Reaktionspartner (Antikörper oder Antigen) an eine Festphase gebunden wird. Beispielsweise können nicht-gebundene Antigene einfach von Antikörper gebundenen Antigenen separiert werden, wenn der Antikörper an eine Festphase gekoppelt ist. Wird der Antikörper oder das Antigen in Form eines Biomoleküls (z.B. Proteins, Nukleinsäure, Polysaccharids, Lectins) oder als Bestandteil einer biologischen Substanz (Gewebeschnitt, Mikroorganismus, Zelle) an die feste Phase gebunden, spricht man von einem Festphasen-gebundenen Bioreagenz.

**[0003]** Festphasen-Tests sind im Allgemeinen leichter auszuführen, sensitiver und einfacher zu automatisieren als Flüssigphasen-Tests, bei denen sich die Reaktionspartner als auch die Reaktionsprodukte in Lösung befinden.

**[0004]** Eine besondere Form der diagnostischen Festphasen-Tests stellt der sogenannte indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) dar. Um beispielsweise Autoantikör-

per oder Infektionsantikörper in einer Patientenprobe zu identifizieren, werden Zellen, Gewebeschnitte oder aufgereinigte, biochemisch charakterisierte Substanzen als Antigen-Substrate auf einem Mikroskop-Objektträger eingesetzt. In einem ersten Inkubationsschritt binden sich bei positiven Proben die nachzuweisenden Antikörper aus verdünntem Patientenserum an die Festphasen-gebundenen Antigene. In einem zweiten Inkubationsschritt werden diese Antikörper mit Fluoreszenz-markierten Anti-Human-Antikörpern sichtbar gemacht. Im Fluoreszenzmikroskop werden die gebundenen Antikörper und ggf. deren spezifische Lokalisation innerhalb der Substrat-Zelle oder des Substrat-Gewebes identifiziert.

**[0005]** Indirekte Immunfluoreszenztests ermöglichen eine hohe Spezifität, d.h. positive und negative Proben ergeben einen großen Signalunterschied. Des Weiteren zeigt sich für jeden gebundenen Antikörper ein typisches Fluoreszenzmuster, je nach Lokalisation der einzelnen Antigene, was zur Identifizierung der Autoantikörper des Patienten genutzt werden kann. Ferner steht das gesamte Antigenspektrum der Ausgangssubstrate zur Verfügung, so dass viele Antikörper erfasst werden und eine hohe Trefferquote erzielt werden kann. Außerdem ist der indirekte Immunfluoreszenztest die Methode der Wahl, wenn es nicht möglich ist, Testantigene analyssegerecht für Enzymimmuntests aufzubereiten.

**[0006]** Die Firma EUROIMMUN (Lübeck, Deutschland) hat ein besonderes Herstellungsverfahren und besonders bestückte Objektträger entwickelt, um IFTs effizient durchzuführen. Es werden Objektträger angeboten, die mit mehreren mit biologischem Material beschichteten Deckgläsern ("BIOCHIP") bestückt sind. Die BIOCHIP-Technologie umfasst einen Aktivierungsschritt, bei dem Kulturzellen oder Gewebeschnitte auf physikalisch oder chemisch aktivierte Deckgläser aufgebracht werden. Ferner können Gefrierschnitte kovalent auf der Glasoberfläche verankert werden. Die starke Haftung zwischen Substrat und Deckglas ermöglicht es, die Deckgläser mit dem biologischen Material maschinell in millimetergroße Fragmente (BIOCHIPS) zu unterteilen. So lassen sich pro Gewebeschnitt 10 und mehr Präparate von einheitlicher Qualität gewinnen.

**[0007]** In EP 0117262 B1 werden die oben genannten BIOCHIPS offenbart.

**[0008]** In EP 1718948 B1 wird der oben genannte IIFT und ein entsprechendes Herstellungsverfahren von BIOCHIPS beschrieben. Bei diesem Herstellungsverfahren wird eine Nadel verwendet, die eine Klebefolie durchsticht, auf der sich mit biologischem Material beschichtete Deckglasfragmente befinden. Die Nadel durchsticht die Folie so, dass die Deckglasfragmente durch einen Saugnapf von der Folie entnommen werden können. Mit diesem Herstellungsverfahren können allerdings keine größeren (größer als 3,25 mm Kantenlänge) BIOCHIPS hergestellt werden.

**[0009]** Für unterschiedliche Anwendungen, z.B. pathologische Untersuchungen von Patientengewebe oder die gleichzeitige Untersuchung mehrerer verschiedener

Gewebearten, wäre es wünschenswert auch größere BIOCHIPS herstellen zu können. Daher besteht ein Bedarf an einem Verfahren, das eine reproduzierbare Herstellung von größeren mit biologischem Material beschichteten Deckgläsern erlaubt, sowie an derartigen beschichteten Deckgläsern.

**[0010]** Herstellungsverfahren, mit biologischem Material beschichtete Festphasenfragmente, diese umfassende Träger und Vorrichtungen zu anderen Herstellung, die größere als im Stand der Technik bekannte BIOCHIPS umfassen, werden nachfolgend beschrieben und sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

**[0011]** Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben überraschenderweise gefunden, dass die Verwendung einer Nadel im Ablöseschritt von Herstellungsverfahren von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten durch einen Schritt des Vorlösens mit einem Hebepkopf ersetzt werden kann. Durch diese Änderung ist die Herstellung wesentlich größerer Festphasenfragmente/Deckglasfragmente möglich. Im Detail wird im erfindungsgemäßen Verfahren an einer Folie, die mit Festphasenfragmenten beschichtet ist, eine Zugspannung erzeugt. Anschließend wird die Folie mit einem Hebepkopf kontaktiert, um ein oder mehrere Festphasenfragmente von der Folie vorzulösen.

**[0012]** In einem ersten Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung daher auf ein Verfahren zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten, umfassend:

- Bereitstellen eines mit biologischem Material beschichteten Festphasenträgers, wobei der Festphasenträger fragmentiert ist und die Fragmente an einer Folie haften;
- Erzeugen einer Zugspannung an der mit den Festphasenfragmenten beschichteten Folie;
- Kontaktieren der Folie mit einem Hebepkopf, um ein oder mehrere Festphasenfragmente von der Folie vorzulösen; und
- Abnehmen des einen oder der mehreren vorgelösten Festphasenfragmente von der Folie.

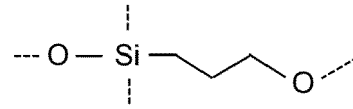
**[0013]** Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden nachfolgend beschrieben, wobei (a) die mit biologischem Material beschichtete Oberfläche (2) des Festphasenfragments mindestens 10,25 mm<sup>2</sup>, bevorzugt mindestens 25 mm<sup>2</sup> umfasst; (b) die Länge mindestens einer Kante (4, 5) des Festphasenfragments größer als 3,25 mm, bevorzugt größer als 5 mm ist; und/oder (c) das Festphasenfragment ein Glasfragment ist.

**[0014]** In bevorzugten Ausführungsformen ist die Festphasenfragmentdicke (3) zwischen 0,05 mm und 0,3 mm, bevorzugt zwischen 0,1 mm und 0,2 mm.

**[0015]** In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist das biologische Material über ein Linkermolekül an den Festphasenträger gebunden. Das Linkermolekül kann (a) eine Silicium umfassende Verbindung, bevorzugt ein

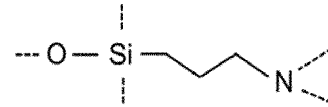
Silylether sein; oder (b) eine Struktur ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

5



und

10



15

umfassen.

**[0016]** In bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist mindestens 70%, bevorzugt mindestens 85% der Oberfläche (2) des Festphasenfragments mit biologischem Material beschichtet.

20

**[0017]** Ferner umfasst das Verfahren in bevorzugten Ausführungsformen, dass im Kontaktierungsschritt der Hebepkopf die Folie in Richtung der beschichteten Oberfläche (2) des Festphasenfragments drückt. In weiter bevorzugten Ausführungsformen wird über das Drücken durch den Hebepkopf die Folie nicht beschädigt, zerrissen oder zerstoßen.

25

**[0018]** In weiteren bevorzugten Ausführungsformen wird die Zugspannung dadurch erzeugt, dass die Folie über einen, bevorzugt kreisförmigen Rahmen gespannt ist.

30

**[0019]** In bevorzugten Ausführungsformen erfolgt das Abnehmen über eine Entnahmeeinheit mit Saugnapf.

**[0020]** In weiteren bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Folie eine Klebefolie, die (a) Polyvinylchlorid (PVC); und/oder (b) Acrykleber umfasst.

35

**[0021]** In einem zweiten Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf ein mit biologischem Material beschichtetes Festphasenfragment, erhältlich durch das erfindungsgemäße Verfahren.

40

**[0022]** In einem dritten Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf einen Träger, auf dem mindestens ein erfindungsgemäßes Festphasenfragment aufgebracht ist.

45

**[0023]** In einem vierten Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf eine Vorrichtung zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten, umfassend:

50

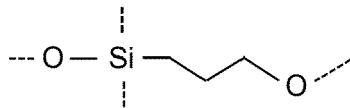
- Zugspannungseinheit ausgebildet zum Erzeugen von Zugspannung an einer Folie;
- Hebepkopfeinheit ausgebildet zum Vorlösen von Festphasenfragmenten von einer Folie; und
- Entnahmeeinheit ausgebildet zum Abnehmen von Festphasenfragmenten von einer Folie.

55

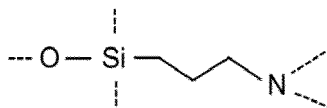
**[0024]** In bevorzugten Ausführungsformen umfasst

die erfindungsgemäße Vorrichtung ferner mindestens eine Steuereinheit.

**[0025]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung richtet sich auf ein Festphasenfragment, das mit biologischen Material beschichtet ist und wobei (a) die mit biologischem Material beschichtete Oberfläche (2) des Festphasenfragments mindestens 10,25 mm<sup>2</sup>, bevorzugt mindestens 25 mm<sup>2</sup> umfasst; und/oder (b) die Länge mindestens einer Kante (4, 5) des Festphasenfragments größer als 3,25 mm, bevorzugt größer als 5 mm ist. Bevorzugt ist das Festphasenfragment ein Glasfragment. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Festphasenfragmentdicke (3) zwischen 0,05 mm und 0,3 mm, bevorzugt zwischen 0,1 mm und 0,2 mm. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist das biologische Material über ein Linkermolekül an den Festphasenträger gebunden. Das Linkermolekül kann (a) eine Silicium umfassende Verbindung, bevorzugt ein Silylether sein; oder (b) eine Struktur ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus



und



umfassen. In bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Festphasenfragments ist mindestens 70%, bevorzugt mindestens 85% einer Oberfläche (2) mit biologischem Material beschichtet.

**[0026]** Der Ausdruck "biologisches Material", wie hierin verwendet, bezieht sich auf Material, das aus lebenden Organismen isoliert oder abgeleitet wird. Beispiele für biologisches Material umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Proteine, Nukleinsäuren, Lipide, Zellen, Gewebe, Gewebeschnitte, Organe, Organschnitte, zellbasierte Konstrukte oder Kombinationen davon. In einigen Aspekten kann sich biologisches Material auf Säugetierzellen beziehen. In anderen Aspekten kann sich biologisches Material auf immortalisierte Zellkulturen, Blutplättchen, Bakterien, Viren, Säugetierzellmembranen, Liposomen, Enzyme oder Kombinationen davon beziehen. In anderen Aspekten kann sich biologisches Material auf Fortpflanzungszellen beziehen, einschließlich Samenzellen, Spermatozyten, Oozyten, Eizellen, Embryonen, Keimbläschen oder Kombinationen davon. In anderen Aspekten kann sich biologisches Material auf Vollblut, Serum, rote Blutkörperchen, weiße Blutzellen, Blutplättchen, Zerebrospinalflüssigkeit, Viren, Bakterien, Algen, Pilze oder Kombinationen davon beziehen. Biologisches Material umfasst auch rekombinant hergestellte und ggf.

aufgereinigte Proteine und Antikörper, wie eine homogene Population monoklonaler oder eine heterogene Population polyklonaler Antikörper.

**[0027]** Der Ausdruck "Beschichtung", wie er in dieser Anmeldung verwendet wird, soll sich auf das Aufbringen von biologischem Material auf die Oberfläche eines Festphasenfragments beziehen. Die Beschichtung umfasst die Bindung durch Adhäsionskräfte, die Bindung durch ein Linkermolekül, Filmbeschichtung und Inkrustierung. Die Beschichtung kann vollständig oder teilweise sein, beispielsweise über 30% oder mehr, über 40% oder mehr, über 50% oder mehr, über 60% oder mehr, über 70% oder mehr, über 75% oder mehr, über 80% oder mehr, über 85% oder mehr, über 90% oder mehr, über 95% oder mehr, über 97% oder mehr der Oberfläche des Festphasenfragments. In weiter bevorzugten Ausführungsformen wird die Beschichtung vorzugsweise im Wesentlichen über die gesamte Oberfläche des Festphasenfragments aufgebracht.

**[0028]** Der Ausdruck "Linkermolekül" oder "Linker", wie hierin austauschbar verwendet, bezieht sich auf jede molekulare Einheit, die eine Bindungsanlagerung mit einem Abstand zwischen zwei oder mehr Molekülen, Molekülgruppen und/oder Moleküleinheiten vermittelt. Bevorzugt besitzt das Linkermolekül eine kovalente Bindung an das Festphasenfragment und eine weitere kovalente Bindung an das biologische Material. Beispielhafte Linker, die in Festphasenfragmenten und Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind Polymere, beispielsweise Polyethylenglycol (PEG)-Einheiten, wobei die Polymerketten weiterhin Alkyl-, Alken-, Alkin-, Ester-, Ether-, Amid-, Imid-, Sulfo- und/oder Phosphodiestergruppen umfassen können. Besonders bevorzugt ist das Linkermolekül eine Silicium (Si) umfassende Verbindung, noch weiter bevorzugt ein Silylether der Grundstruktur R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>Si-O-R<sub>4</sub>, wobei R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> nicht-substituierte oder substituierte organische Gruppen und R<sub>4</sub> eine Alkyl- oder Arylgruppe darstellen.

**[0029]** "Festphasenfragment", wie hierin verwendet, bezieht sich auf jedes Festphasenmaterial, an das ein Biomolekül angeheftet werden kann. Beispielhafte feste Substrate, die mit biologischen Material und Verfahren der vorliegenden Offenbarung verwendet werden können, umfassen Kügelchen, Objektträger, Vertiefungen, Chips, die aus verschiedenen Festphasenmaterialien einschließlich Glas, Polymer und Silizium hergestellt werden können. Besonders bevorzugt ist das Festphasenfragment ein mit biologischem Material beschichteter Glasträger. Der Ausdruck "Festphasenträger", wie hierin verwendet, bezeichnet ein festes beschichtetes Substrat wie oben beschrieben, jedoch vor seiner Fragmentierung. Insofern treffen die oben genannten Materialeigenschaften eines Festphasenfragments auch auf einen Festphasenträger zu.

**[0030]** Der Ausdruck "fragmentiert", wie hierin verwendet, richtet sich auf Festphasenträger, die in zwei oder mehr Teilstücke (Fragmente) verkleinert werden. Dem

Fachmann sind diverse Techniken zum Fragmentieren, insbesondere von beschichteten Glaträgern, bekannt. Diese umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Brechen, Schneiden (durch ein Schneidegerät mit Klinge oder Wasserstrahl), Lasern und Ritzen. Die Form der sich ergebenden Teilstücke kann einheitlich oder divers sein. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Teilstücke einheitlich geformt, insbesondere als Rechtecke. In noch weiter bevorzugten Ausführungsformen sind die Teilstücke Quadrate. Bevorzugt besitzen die fragmentierten Teilstücke mindestens eine Oberfläche, die nicht größer als 1500 mm<sup>2</sup>, nicht größer als 1000 mm<sup>2</sup>, nicht größer als 750 mm<sup>2</sup>, nicht größer als 500 mm<sup>2</sup>, nicht größer als 400 mm<sup>2</sup>, nicht größer als 300 mm<sup>2</sup>, nicht größer als 200 mm<sup>2</sup> oder nicht größer als 120 mm<sup>2</sup> ist. In anderen bevorzugten Ausführungsformen ist die Kantenlänge (4, 5) mindestens einer Seite nicht länger als 150 mm<sup>2</sup>, nicht länger als 130 mm<sup>2</sup>, nicht länger als 100 mm<sup>2</sup>, nicht länger als 80 mm<sup>2</sup>, nicht länger als 50 mm<sup>2</sup>, nicht länger als 40 mm<sup>2</sup>, nicht länger als 30 mm<sup>2</sup> oder nicht länger als 25 mm<sup>2</sup>.

**[0031]** Der Ausdruck "Folie", wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine Adhäsionsfolie oder eine Klebefolie. Eine Adhäsionsfolie im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Folie, die durch Adhäsionskräfte an ihrer Oberfläche eine Haftung an Glas, bevorzugt mit einer Dicke zwischen 0,001 mm und 1,5 mm, ermöglicht. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Adhäsionsarbeit, d.h. die Kraft, die aufgewendet werden muss um die Adhäsionsfolie und das Festphasenfragment zu trennen, mindestens 0,00001 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,00001 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,00001 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,00001 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,0001 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,001 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,01 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,1 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 1 J/mm<sup>2</sup>, mindestens 10 J/mm<sup>2</sup> oder mindestens 100 J/mm<sup>2</sup>.

**[0032]** Unter "Klebefolie", wie hierin verwendet, wird eine einseitig oder beidseitig mit einem Klebstoff versehene (Kunststoff)Folie verstanden. Ein Klebstoff ist natürliches oder synthetisches Material, das an der Stelle der topischen Anwendung haften kann. Bevorzugt kann der Klebstoff an Glas haften. Weiter bevorzugt sind geeignete Klebstoffe ausgewählt aus Polyisobutylen, Acrylate, Silicone, Polyisoalkylene, Polyetherblockamidcopolymere, Polybutadien, Styrol-Butadien (oder Isopren)-Styrol-Blockcopolymer-Kautschuk, auf Vinyl basierende hochmolekulare Materialien wie z.B. Polyvinylalkylether, Polyvinylacetat, Ethylvinylacetat-Copolymere, ein teilweise verseifte Produkte von Polyvinylacetat, Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon, Polyurethan oder eine Kombination davon. In bevorzugten Ausführungsformen ist der Klebstoff ein Acrylkleber. Die Acrylklebstoffe umfassen vernetzte und unernetzte Acrylcopolymere, ausgewählt aus Polymethacrylat, wie Butylacrylat, Ethylhexylacrylat, Vinylacetat, (Meth)acrylsäure, wie Butyl(meth)acrylat, Pentyl(meth)acrylat, Hexyl(meth)acrylat, Heptyl(meth)acrylat, Octyl(meth)acrylat, Nonyl(meth)acrylat, De-

cyl(meth)acrylat, Undecyl(meth)acrylat, Dodecyl(meth)acrylat und Tridecyl(meth)acrylat und Copolymere von mindestens einem der obigen Ester und andere damit copolymerisierbare Monomere. Bevorzugte Acrylatpolymere sind im Handel unter dem Handelsnamen Gelva®, z.B. Gelva® 3011 oder DuroTak®, erhältlich von National Starch and Chemical Company, und Zutphen, Holland, z.B. DuroTak® 202A, DuroTak® 608, DuroTak® 4201, DuroTak® 2510, DuroTak® 8710, DuroTak® 87-2353, DuroTak® 87-2353, DuroTak® 87-2353, DuroTak® 87-2353 ® 387-2051 oder DuroTak® 387-2052. In weiter bevorzugten Ausführungsformen ist die Klebefolie die Folie 1009R (Silicone-free blue) oder die Folie 1020R (UV curable adhesive film (PVC)) jeweils hergestellt und vertrieben von Ultron Systems (Moorpark, USA).

**[0033]** Das Folienmaterial (von Adhäsions- und Klebefolie) kann ein dünnes flexibles Folienmaterial sein und umfasst Polymerfilme, wie Polyvinylchlorid (PVC), Polyethylen (PE), Polypropylen (PP), Polyethylenterephthalat (PET), Polystyrol (PS), Polyamid (PA), vergleichbare Polymere und Kombinationen davon; und Metallfolien, wie Aluminium (Al). Bevorzugt wird eine Polyvinylchlorid (PVC) Folie verwendet.

**[0034]** Der Ausdruck "Zugspannung" oder "mechanische Spannung", wie hierin austauschbar verwendet, wird durch das Symbol " $\sigma$ " dargestellt und ist auf einer gedachten Schnittfläche durch einen Körper die Kraftkomponente  $F_i$  in i-Richtung bezogen auf die Fläche A (Normale n), auf der sie wirkt. Sie kann wie folgt berechnet werden:

$$\sigma_{ni} = \lim_{\Delta A \rightarrow 0} \frac{\Delta F_i}{\Delta A}$$

**[0035]** In bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Zugspannung an der mit Festphasenfragmenten bestückten Folie mindestens 0,00001 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,00001 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,00001 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,00001 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,0001 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,001 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,01 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 0,1 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 1 N/mm<sup>2</sup>, mindestens 10 N/mm<sup>2</sup> oder mindestens 100 N/mm<sup>2</sup>.

**[0036]** "Hebekopf", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Arbeitsmittel, das mit einer mit Festphasenfragmenten bestückten Folie in Kontakt gebracht werden kann und das so ausgebildet ist, dass mit dessen Hilfe die Fragmente von der Folie durch das erfindungsgemäße Verfahren entnommen werden können. Insofern besitzt der Hebekopf mindestens eine Seite/Fläche, mit der die Folie kontaktiert werden kann. Diese Seite/Fläche des Hebekopfs kann jegliche Formen haben, ist aber bevorzugt rund oder oval. In anderen bevorzugten Ausführungsformen hat diese Fläche/Seite des Hebekopfs einen Umfang oder Durchmesser von 0,001 mm bis 6 mm, von 0,05 mm bis 5 mm, von 0,1 mm bis 4 mm, von 0,5 mm bis 3 mm, von 0,7 mm bis 2 mm oder von 1 mm bis

1,5 mm. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen besitzt die erfindungsgemäße Hebekopfereinheit mindestens einen Hebekopf, der wie oben beschrieben ausgebildet ist.

**[0037]** Der Ausdruck "vorlösen", wie hierin verwendet, bezieht sich auf das partielle Ablösen eines Festphasenfragments von der Folie. In bevorzugten Ausführungsformen bezeichnet "vorlösen" das Ablösen von mindestens 20%, mindestens 30%, mindestens 35%, mindestens 40%, mindestens 45%, mindestens 50%, mindestens 55%, mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 85%, mindestens 90%, mindestens 93% oder mindestens 97% einer Oberflächenseite des Festphasenfragments von der Folie. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein, wird vermutet, dass das Vorlösen im erfindungsgemäßen Verfahren durch das Zusammenwirken der Zugspannung auf die Folie und das Kontaktieren und Drücken des Hebekopfs in Richtung der beschichteten Oberfläche entsteht. Durch eine derartige Bewegung des Hebekopfs unter dem Festphasenfragment scheint die Folie ausgelenkt zu werden und sich von den Bereichen des Fragments zu lösen, die nicht durch den Hebekopf berührt werden (siehe Figur 5).

**[0038]** Der Ausdruck "abnehmen" oder "entnehmen", wie hierin austauschbar verwendet, bezieht sich auf das finale Ablösen des Festphasenfragments von der Folie. D.h. 100% zuvor gebundenen Oberflächenseite des Festphasenfragments sind von der Folie abgelöst. Nach dem Abnehmen besteht zwischen dem Festphasenfragment und der Folie keine direkte oder indirekte Verbindung. Ein solcher Schritt wird bevorzugt über eine Einheit mit einem Saugnapf ausgeführt.

**[0039]** Eine mit biologischem Material beschichtete Oberfläche des Festphasenfragments ist in Figur 1 unter dem Bezugszeichen (2) dargestellt. Die Größe der Oberfläche wird durch die Kanten (4) und (5) bestimmt. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die mit biologischem Material beschichtete Oberfläche (2) des Festphasenfragments mindestens 5 mm<sup>2</sup>, mindestens 10 mm<sup>2</sup>, mindestens 10,25 mm<sup>2</sup>, mindestens 15 mm<sup>2</sup>, mindestens 20 mm<sup>2</sup>, mindestens 25 mm<sup>2</sup>, mindestens 30 mm<sup>2</sup>, mindestens 40 mm<sup>2</sup>, mindestens 45 mm<sup>2</sup> oder mindestens 50 mm<sup>2</sup>.

**[0040]** Kanten des mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragments sind in Figur 1 unter den Bezugszeichen (4) und (5) dargestellt. Bevorzugt ist die Länge mindestens einer Kante (4, 5) des Festphasenfragments größer als 1 mm, größer als 1,5 mm, größer als 2 mm, größer als 2,5 mm größer als 3,25 mm, größer als 4 mm, größer als 4,5 mm, größer als 5 mm, größer als 7 mm, größer als 10 mm, größer als 15 mm, größer als 20 mm oder größer als 22 mm. In alternativen Ausführungsformen sind beide Kanten (4) und (5) jeweils größer als die zuvor genannten Längen.

**[0041]** Die Festphasenfragmentdicke ist in Figur 1 unter dem Bezugszeichen 3 dargestellt. Bevorzugt ist die Festphasenfragmentdicke zwischen 0,001 mm und 1,5

mm, zwischen 0,005 mm und 1 mm zwischen 0,01 mm und 0,8 mm, zwischen 0,05 mm und 0,6 mm zwischen 0,06 mm und 0,5 mm, zwischen 0,07 mm und 0,4 mm zwischen 0,08 mm und 0,3 mm und zwischen 0,1 mm und 0,2 mm. Für die Dicke des Festphasenträgers sind die Werte identisch.

**[0042]** Der Ausdruck "in Richtung der beschichteten Oberfläche drücken", wie hierin verwendet, bedeutet, dass der Hebekopf auf der Folie auf der nicht-bestückten Seite direkt unterhalb eines Festphasenfragments angesetzt wird und dieses nach oben drückt. Beim Drücken ändern sich einerseits die Position des Hebekopfs und andererseits die Positionen der Folie und der darauf angebrachten Festphasenfragmente relativ zueinander. Dies kann zum einen dadurch geschehen, dass die Folie starr in ihrer Position verharrt, während der Hebekopf in einer Bewegung von unten nach oben geführt wird. Alternativ kann der Hebekopf starr in einer Position bleiben, während die Folie und die darauf haftenden Festphasenfragmente über den Hebekopf gedrückt werden. In einer dritten Alternative können sich der Hebekopf und die Folie aufeinander zu bewegen, in dem sowohl der Hebekopf als auch die Folie beide ihre Positionen verändern. In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist der Hubweg des Hebekopfes in Richtung (oder umgekehrt) 0,1 mm bis 30 mm, 0,3 mm bis 25 mm, 0,5 mm bis 20 mm, 0,8 mm bis 15 mm, 1 mm bis 13 mm, 3 mm bis 10 mm, 4 mm bis 8 mm oder 5,5 mm bis 6,5 mm.

**[0043]** "Nicht beschädigen, zerreißen oder zerstechen", wie hierin verwendet, bezieht sich darauf, dass der Hebekopf nach dem Kontaktieren und Drücken an der Folie keine Schäden hinterlässt. Keine Schäden im Sinne der vorliegenden Offenbarung sind Dehnungen und Verfärbungen der Folie. Schäden im Sinne der vorliegenden Offenbarung sind das Entstehen von Löchern oder Rissen in der Folie, das Entstehen von abstehenden Fasern auf der Folienoberfläche und das Auftreten von Piling, d.h. einer lokalen Anhäufung von Folienmaterial. Daher lenkt der Hebekopf die Folie und die Festphasenfragmente nach Kontaktieren nur aus und hinterlässt ggf. Dehnungen und Verfärbungen auf der Folie.

**[0044]** Der Ausdruck "Rahmen", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein Einspannsystem, auf das eine Folie aufgezogen werden kann. Derartige Systeme sind z.B. als Spannsätze aus der Waferproduktion bekannt. Kommerziell erhältlich sind verwendbare Spannsätze u.a. von Minitron Elektronik GmbH (Ingolstadt, Deutschland), Technovision, Inc. (Nakayama, Japan), Ultron Systems, Inc. (Moorpark, USA) und Thai-Hibex (Pathumthani, Thailand). In bevorzugten Ausführungsformen ist der hierin beschriebene Rahmen ein Teil der erfindungsgemäßen Zugspannungseinheit.

**[0045]** Eine Entnahmeeinheit mit einem Saugnapf, wie sie für die Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist, wird beispielhaft in EP 1718948 B1 in den Absätzen [0059] bis [0061] und [0063] bis [0066] beschrieben und ist hiermit durch Verweis Gegenstand der vorliegenden Offenbarung.

**[0046]** Ein "Träger", wie hierin verwendet, bezieht sich auf einen Festkörper, an den die erfindungsgemäßen Festphasenfragmente angebracht werden können. Der Träger besitzt mindestens eine ebene Fläche, auf der das oder die Festphasenfragmente aufgebracht werden können. In bevorzugten Ausführungsformen besteht oder umfasst das Trägermaterial Glas, Polymer oder Silizium. Die Festphasenfragmente und der Träger werden bevorzugt durch Kleben, Anschmelzen mindestens einer Oberfläche oder durch ein physikalisches Verbindungssystem (z.B. eine Nut-Feder-Verbindung) zusammengebracht. Bevorzugt ist allerdings das Verkleben von Träger und Festphasenfragment. Ferner werden bevorzugt auf einem Träger mindestens ein, mindestens zwei, mindestens drei, mindestens vier, mindestens fünf, mindestens sechs, mindestens sieben, mindestens acht, mindestens neun oder mindestens zehn erfindungsgemäße Festphasenfragmente aufgebracht. In bevorzugten Ausführungsformen kann ein Träger eine Größe von mindestens  $5 \times 25 \text{ mm}^2$ , mindestens  $15 \times 25 \text{ mm}^2$ , mindestens  $25 \times 25 \text{ mm}^2$ , mindestens  $40 \times 25 \text{ mm}^2$  oder mindestens  $60 \times 25 \text{ mm}^2$  besitzen. Beispielsweise kann ein Träger der Größe von mindestens  $5 \times 25 \text{ mm}^2$  mit insgesamt 5 Festphasenfragmenten mit jeweils einer Größe von  $5 \times 5 \text{ mm}^2$ ; 20 Festphasenfragmenten mit jeweils einer Größe von  $2,5 \times 2,5 \text{ mm}^2$ ; oder 125 Festphasenfragmenten mit jeweils einer Größe von  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  bestückt werden.

**[0047]** Eine "Vorrichtung zur Herstellung der erfindungsgemäßen Festphasenfragmente", wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein oder mehrere Werkteile, die eine Zugspannungseinheit, eine Hebekopfseinheit und eine Entnahmeeinheit, wie hierin beschrieben, umfassen. Die genannten Einheiten können von den anderen Einheiten völlig oder teilweise getrennt vorliegen und ein Herstellungssystem bilden oder alle Einheiten können direkt oder indirekt mit einander verbunden sein.

**[0048]** Der Ausdruck "Antikörper", wie hierin verwendet, bezieht sich auf Proteine aus der Klasse der Globuline, die in Wirbeltieren als Reaktion auf bestimmte Stoffe, so genannte Antigene, gebildet werden. Antikörper sind Bestandteile des Immunsystems. Antikörper werden von einer Klasse weißer Blutzellen, den B-Lymphozyten, produziert. Sie können anhand verschiedener Klassen unterschieden werden, nämlich Immunglobulin A, Immunglobulin D, Immunglobulin E, Immunglobulin G, Immunglobulin M, Immunglobulin W und Immunglobulin Y.

**[0049]** Der Ausdruck "Antigen", wie hierin verwendet, bezieht sich bevorzugt auf Stoffe, an die sich Antikörper und bestimmte Lymphozyten-Rezeptoren spezifisch binden können. Antigene können Proteine, aber auch Glykoproteine, Kohlenhydrate, Lipide oder andere Stoffe sein. Vorliegend sind die Antigene bevorzugt Proteine oder posttranslational modifizierte Proteine.

**[0050]** Generell bedeutet "mindestens 1", wie hierin verwendet, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder mehr, wobei sich die Angabe ggf. auf die Art des genannten Stoffes und nicht die absolute Anzahl der Moleküle bezieht.

**[0051]** Je nach bestimmten Implementierungsanforderungen können Ausführungsbeispiele der Erfindung die Steuereinheit in Hardware und/oder in Software umsetzen. Eine Umsetzung der hier genannten Steuereinheit kann hier als wenigstens eine Steuereinheit erfolgen oder aber durch mehrere Steuereinheiten im Verbund. Die Implementierung kann unter Verwendung eines digitalen Speichermediums, beispielsweise einer Floppy-Disk, einer DVD, einer Blu-Ray Disc, einer CD, eines ROM, eines PROM, eines EPROM, eines EEPROM oder eines FLASH-Speichers, einer Festplatte oder eines anderen magnetischen oder optischen Speichers durchgeführt werden, auf dem elektronisch lesbare Steuersignale gespeichert sind, die mit einer programmierbaren Hardwarekomponente derart zusammenwirken können oder zusammenwirken, dass das jeweilige Verfahren durchgeführt wird.

**[0052]** Eine programmierbare Hardwarekomponente kann als Steuereinheit durch einen Prozessor, einen Computerprozessor (CPU = Central Processing Unit), einen Computer, ein Computersystem, einen anwendungsspezifischen integrierten Schaltkreis (ASIC = Application-Specific Integrated Circuit), einen integrierten Schaltkreis (IC = Integrated Circuit), ein Ein-Chip-System (SOC = System on Chip), ein programmierbares Logikelement oder ein feldprogrammierbares Gatterarray mit einem Mikroprozessor (FPGA = Field Programmable Gate Array) gebildet sein.

**[0053]** Obwohl manche Aspekte im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Festphasenfragmenten beschrieben wurden, versteht es sich, dass diese Aspekte auch eine Beschreibung des entsprechenden (Herstellungs-)Verfahrens darstellen und umgekehrt.

**[0054]** Zur Vorbereitung für das erfindungsgemäße Verfahren können mit biologischem Material beschichtete Festphasenträger wie folgt hergestellt werden: Biologische Substanzen, wie beispielsweise oben genannt, werden zunächst auf ein Trägermaterial, z.B. papierdünnes ( $0,15 \text{ mm}$ ) Glas, wie ein Deckglas, aufgebracht. In der Regel bleibt die biologische Aktivität der zur Beschichtung eingesetzten biologischen Substanzen, die als Substrate bezeichnet werden, unvermindert erhalten. Falls erforderlich kann das biologische Material durch ein Linker-Molekül an den Träger kovalent gebunden werden.

**[0055]** Das mit biologischer Substanz beschichtete Trägermaterial, z.B. ein Deckglas, wird auf einer mit einem Haftkleber versehenen Kunststoff-Folie, beispielsweise in Form eines Folienrings, befestigt, wobei die biologische Substanz nicht mit der Kunststoff-Folie in Kontakt kommt. Dieser Folienring kann eine Zugspannungseinheit (12) darstellen, die in bevorzugten Ausführungsformen mit einer Steuereinheit (15) in Verbindung steht und durch das Steuersignal SIG2 gesteuert werden kann, z.B. um den Entnahmevorgang auf der erfindungsgemäßen Vorrichtung elektronisch zu starten (siehe Figur 2).

**[0056]** Das Deckglas wird mit der Substanzschicht, al-

so der Substratseite, nach unten in eine Einsparung oder Schablone einer Vorrichtung gelegt, wobei der nicht beschichtete Deckglasrand aufliegt. Die Schablone dient der definierten Ausrichtung des Deckglases in Position zu Folie und Drehwinkel. Durch Adhäsion wird das Deckglas an die Folie geheftet, wobei die unbeschichtete Seite des Deckglases auf die im Folienring befindliche Folie trifft.

**[0057]** Das Trägermaterial (Deckglas) wird dann, im Verbund mit den biologischen Substanzen (Substrat), unter Verwendung einer Diamant-armierten Vorrichtung (Fragmentiermaschine oder Fragmentiereinheit) in millimetergroße Fragmente (Festphasenfragmente) unterteilt, ohne dass die Folie zerschnitten wird.

**[0058]** Nach dem Fragmentieren wird das Substratbestückte Deckglas auf dem Folienring zwischen einer flexiblen Unterlage und einer Andruckwalze zusätzlich gerollt, um noch nicht gebrochene Substratfragmente zu brechen. Die dabei entstandenen Substratfragmente liegen aber so dicht beieinander, dass deren Kanten aneinander reiben. Um dies zu unterbinden, können die Substratfragmente durch konzentrisches Strecken der sich in dem Folienring befindlichen Folie auf Distanz gebracht werden. Zu diesem Zweck wird die zwischen den beiden konzentrischen Ringen geklemmte Folie nach allen Richtungen gereckt, indem beispielsweise der größere Ring durch Eindrücken in einen identischen Ring ersetzt wird. Man erhält dann sauber geschnittene Fragmente mit genauen Abmessungen und eine exakte Aufteilung der Substratfragmente.

**[0059]** Zum erfindungsgemäßen Entnehmen der Festphasenfragmente wird der Folienring auf dem Folienhalter einer Bestückungsmaschine, der in mindestens eine Richtung bewegbar ist, platziert. Der Folienhalter ist im Zentrum durchgängig freigearbeitet.

**[0060]** Die Bestückungsmaschine wird mit Analyseplatten, also beispielsweise bedruckten Objektträgern beladen, die auf einem Transporttablett der Maschine zugeführt werden können. Das Transporttablett kann über einen beweglichen Seitenrand verfügen, der die Objektträger fixiert und so besser positioniert.

**[0061]** Die Bestückungsmaschine ist mit einer Transfereinheit ausgestattet, die aus zwei beweglichen Transportschlitten besteht, die sich auf einer Schiene bewegen. Auf einem Transportschlitten ist ein vakuumunterstützter Saugnapf montiert, der sich angetrieben durch einen Schrittmotor in mindestens zwei, bevorzugt drei Raumrichtung bewegen kann. Der Saugnapf ist pneumatisch unterstützt und drehbar. Außerdem ist der Saugnapf Teil einer Entnahmeeinheit (14), die in bevorzugten Ausführungsformen mit einer Steuereinheit (15) in Verbindung steht und durch das Steuersignal SIG1 gesteuert werden kann, z.B. um die Bewegung des Saugnapfes oder der gesamten Entnahmeeinheit in den Bewegungsrichtungen R1 und R2 elektronisch zu steuern (siehe Figur 2).

**[0062]** Unterhalb des in der Bestückungsmaschine angebrachten Folienrings mit der Substratfragmentbe-

stückten Folie befindet sich eine stempelartige Vorrichtung (Entnahmeeinheit (13)) mit einem Hebekopf, die die Ablösung der Substratfragmente von der Folie unterstützt. Der Hebekopf hebt sich langsam etwa 4-8 mm aus der Ruhestellung hervor (siehe Figur 5), kontaktiert die Folie von unten und bewirkt ein Vorlösen. Das finale Entnehmen wird durch das Ansaugen des Substratfragmentes durch den Saugnapf von oben gesteuert. Der Hebekopf ist Teil einer Hebekopfeinheit (13), die in bevorzugten Ausführungsformen mit einer Steuereinheit (15) in Verbindung steht und durch das Steuersignal SIG3 gesteuert werden kann, z.B. um die Bewegung des Hebekopfs oder der gesamten Hebekopfeinheit (13) in den Bewegungsrichtungen R3 und R4 elektronisch zu steuern (siehe Figur 2).

**[0063]** Ein zweiter sich auf der Transfereinheit der Bestückungsmaschine befindlicher Transportschlitten dient als sogenannter "Kleberschlitten". Er ist mit einer Vorrichtung ausgestattet, die eine bewegliche Klebernadel enthält und über einen Schlauch mit einem Klebstoffreservoir verbunden ist. Vor dem Aufbringen eines Substratfragmentes auf einen Objektträger dosiert oder verteilt die Klebernadel den im Volumen zur Substratfragment-Fläche proportional bemessenen UV-Klebstoff auf die gewählte Bestückungsposition oder Oberfläche des Objektträgers, wobei die Klebernadel mit dem Objektträger in Berührung oder in seine Nähe kommt. Unmittelbar danach wird das Substratfragment auf die Klebstoff-benetzte Stelle des Objektträgers gesetzt. Weitere Substratfragmente werden nun auf gleiche Weise zielgenau auf dem Objektträger platziert. Alternativ kann die Dosierung des Klebstoffes auch kontaktfrei erfolgen. Derartige Systeme sind im Stand der Technik bekannt und werden beispielsweise von der Firma Nordson (Westlake, USA) in Form der "P-Jet CT Jet Ventile", Hochleistungs-Jet-Ventile für die berührungslose Mikrodosierung nieder- bis mittelviskoser Medien, vertrieben.

**[0064]** Die Bestückungsmaschine (Synonym "Vorrichtung zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten") kann Einheiten enthalten, die der In-Prozess-Kontrolle der durchgeführten Arbeitsschritte und der unmittelbaren Fehlerkorrektur dienen.

**[0065]** Der produzierte Träger, der die erfindungsgemäßen Festphasenfragmente umfasst, kann anschließend z.B. verschiedenen Färbetechniken (beispielsweise Hämatoxylin-Eosin-Färbung) zur pathologischen Untersuchung unterzogen werden. Alternativ kann auf dem erfindungsgemäßen Träger ein IIFT-Test, wie beispielsweise von Damoiseaux et al. (Damoiseaux, J. et al. (2009) Journal of Immunological Methods, Journal of Immunological Methods, Band 348, Ausgaben 1-2, Seiten 67-73) beschrieben, durchgeführt werden.

**Fig. 1** zeigt schematisch den Aufbau eines mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragments (1).



**Fig. 2** zeigt schematisch den Aufbau einer Vorrichtung zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten (1), die eine Zugspannungseinheit (12), eine Hebekopfseinheit (13), eine Entnahmeeinheit (14) und eine Steuereinheit (15) umfasst.

**Fig. 3** zeigt diverse Ausführungsformen von Hebeköpfen.

**Fig. 4** zeigt das Ansetzen eines Hebekopfes an eine Folie mit Festphasenfragmenten (1), deren Vorlösen von der Folie und eine Aufsicht auf die Folie nach dem Abnehmen eines Festphasenfragments (1). **(A)** Kontaktieren der Folie mit einem stempelförmigen Hebekopf unterhalb eines Festphasenfragments (1). **(B)** Vorlösen eines Festphasenfragments (1) durch einen stempelförmigen Hebekopf. **(C)** Vorlösen eines Festphasenfragments (1) durch eine Hebekopfseinheit (13), die einen Kugelschreiber umfasst, dessen Spitze als Hebekopf dient. **(D)** Folie mit fragmentiertem Festphasenträger nach dem Abnehmen eines Festphasenfragments (1).

**Fig. 5** zeigt schematisch das Vorlösen eines Festphasenfragments (1) von einer Folie durch einen Hebekopf. **(A)** Haftung eines Festphasenfragments (1) an eine Folie vor Kontaktieren mit einem Hebekopf. Das Festphasenfragment (1) steht mit seiner nicht beschichteten Seite komplett in Kontakt mit der Folie. **(B)** Durch das Erzeugen der Zugspannung an der Folie und das Kontaktieren mit einem Hebekopf, löst sich in der Peripherie der Kontaktstelle das Festphasenfragment (1) von der Folie. Dadurch ist das Festphasenfragment (1) mit seiner nicht beschichteten Seite nur noch partiell in Kontakt mit der Folie.

**Fig. 6** zeigt tabellarisch welche maximalen Festphasenfragmentgrößen durch das Verfahren gemäß EP 1718948 B1 und das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt werden können.

## Beispiele

### Materialien und Geräte:

#### [0066]

- verschiedene Hebeköpfe: Kugelschreiberminen, Zylinderkopfschrauben, 3D-Druck-Köpfe, Pass-Stifte, Pipetten-Spitzen;
- Schraubstock zur Aufnahme des Hebekopfes;
- Folie, bespannt im Folienring und bestückt mit Festphasenfragmenten verschiedener Formate

### Beispiel 1: Verfahren zum Herstellen eines mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragments mit Hilfe eines Vorlöse-Schritts

**[0067]** Auf eine Folie (Ultron Systems Sägefolie 1009R) wurde ein Festphasenträger der Größe  $76 \times 26 \times 0,15 \text{ mm}^3$  aufgezogen und fragmentiert. Der ausgewählte Hebekopf, z.B. der Kopf einer Zylinderkopfschraube (Durchmesser 4,4mm), wurde im Schraubstock möglichst senkrecht eingespannt. Die Folie mit dem fragmentierten Festphasenträger mit dem Format  $4,8 \times 4 \times 8 \times 0,15 \text{ mm}^3$  wurde per Hand so über den Hebekopf geführt, dass sich der Hebekopf mittig unter einem einzelnen Fragment befindet. Die Folie wurde von Hand langsam, möglichst waagrecht, auf dem Hebekopf abgesetzt (Figur 4A). Durch gleichmäßiges Drücken der Folie auf den Hebekopf wurde ein physikalischer Druck auf das anvisierte Fragment ausgeübt. Dieser Druck wurde solange erhöht, bis sich das Fragment von den benachbarten Fragmenten der Folie gelöst hat (Figur 4B und C). Das Lösen zeigt sich durch ein Erhellen der gelösten Folienfläche. Nach diesem Vorgang haftet das Fragment nur noch an der Fläche, wo zuvor der Hebekopf aufgesetzt wurde. Löst man nun das Fragment von der Folie mit Hilfe eines Saugnapfes, bleibt die hell verfärbte Folienfläche in Größe der Hebekopfkontaktfläche weiterzuerkennen (Figur 4D).

**[0068]** Es zeigt sich, dass es bei der erfindungsgemäßen Methode nicht notwendig ist, die Folie ein zweites Mal zu recken, was eine erhebliche Einsparung von Arbeitsschritten erlaubt. Das ausgewählte Fragment wird aus der Gesamtmasse herausgehoben und von der Adhäsionskraft der Folie systematisch gelöst. Die umliegenden Fragmente werden zwar gegebenenfalls entsprechend der Auslenkung der Folie auch etwas angehoben. Die Folie stellt sich jedoch nach Beendigung der Ausübung des Druckes zurück und die Fragmente kehren in ihre Ursprungsposition zurück.

### Beispiel 2: Test mit verschiedenen Hebekopfvarianten

**[0069]** In weiteren Versuchsreihen wurde die Verwendung von verschiedenen Hebekopfvarianten im oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren untersucht. Als Hebekopfvarianten wurden Kugelschreiberminen, Zylinderkopfschrauben, 3D-Druck-Köpfe, Pass-Stifte und Pipetten-Spitzen untersucht (Figur 3).

**[0070]** Es wurde gefunden, dass beim quadratischen Format  $5,0 \times 5,0 \times 0,15 \text{ mm}^3$  ab einem bestimmten Durchmesser des Hebekopfes das Fragment gleichmäßig von der Folie abgehoben wird. Unterhalb dieser Größe des Hebekopfes wird das Fragment gekippt von der Folie gelöst und muss auch gekippt von der Folie abgenommen werden (z.B. durch einen Saugnapf).

**[0071]** Die verwendeten Hebeköpfe mit einem Durchmesser von 1,0 bis 1,5 mm sind in der Lage Fragmente auf allen getesteten Formaten von  $2,5 \times 2,5 \times 0,15 \text{ mm}^3$  bis

5,0x20,0x0,15mm<sup>3</sup> zu vereinzeln.

**[0072]** Um die Reibung des Hebekopfes auf die Folie, insbesondere bei länglichen Fragmenten, zu verringern hat sich die Verwendung von z.B. Kugelschreiberminen-Spitzen als sinnvoll erwiesen.

### Beispiel 3: Herstellung größerer Festphasenfragmente mit dem erfindungsgemäßen Verfahren

**[0073]** Die Größe der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren maximal herstellbaren Festphasenfragmente wurde mit solchen verglichen, die mit dem Verfahren gemäß EP 1718948 B1 hergestellt wurden (Figur 6). In beiden Fällen wurde die Folie Ultron Systems 1009R und ein 0,15 mm dicker Festphasenträger verwendet.

**[0074]** Mit dem Verfahren gemäß EP 1718948 B1 können reproduzierbar maximal Fragmente von 3,2x3,2mm<sup>2</sup> Kantenlänge und dementsprechend einer Oberfläche von 10,24 mm<sup>2</sup> hergestellt werden. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren war es möglich Fragmente mit einer Kantenlänge von 25x5,0mm<sup>2</sup> und einer Oberfläche von 125 mm<sup>2</sup> herzustellen. Dies entspricht mehr als dem 12,2-fachen der maximalen Oberfläche von Fragmenten, die gemäß dem Verfahren von EP 1718948 B1 hergestellt wurden. Die Herstellung noch größerer Fragmente mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde nicht untersucht.

**[0075]** Die Erfindung wird hierin generisch und allgemein beschrieben. Jede der engeren Arten und Untergruppen, die unter die generische Offenbarung fallen, bilden auch einen Teil der Erfindung. Dies schließt die allgemeine Beschreibung der Erfindung mit einer Vorbehalts- oder Negativbeschränkung ein, die jeden Gegenstand von einer (Unter-)Gruppe entfernt, unabhängig davon, ob der ausgeschnittene Gegenstand hier spezifisch zitiert ist oder nicht. Andere Ausführungsformen sind in den folgenden Ansprüchen enthalten.

**[0076]** Ein Fachmann wird leicht erkennen, dass die vorliegende Erfindung gut dazu geeignet ist, die Aufgaben auszuführen und die erwähnten Vorteile sowie die damit verbundenen Ziele zu erreichen. Ferner ist es für den Fachmann ohne weiteres ersichtlich, dass verschiedene Substitutionen und Modifikationen an der hier offenbarten Erfindung vorgenommen werden können, ohne vom Umfang und Geist der Erfindung abzuweichen. Die hierin beschriebenen Verfahren, Verwendungen, Behandlungen, Moleküle und Festphasenfragmente sind repräsentativ für bevorzugte Ausführungsformen, die beispielhaft sind und nicht als Beschränkungen des Umfangs der Erfindung gedacht sind. Änderungen darin und andere Verwendungen werden dem Fachmann einfallen, die im Umfang der Erfindung eingeschlossen sind und durch den Umfang der Ansprüche definiert sind. Die Auflistung oder Diskussion eines zuvor veröffentlichten Dokuments in dieser Beschreibung sollte nicht notwendigerweise als Bestätigung dafür verstanden werden, dass das Dokument zum Stand der Technik gehört oder allgemein bekannt ist.

**[0077]** Die hierin veranschaulichend beschriebene Erfindung kann in geeigneter Weise in Abwesenheit von irgendeinem Element oder Beschränkungen, die hier nicht speziell offenbart sind, ausgeführt werden. So werden beispielsweise die Ausdrücke "umfassend", "einschließlich", "enthaltend" usw. umfassend und ohne Einschränkung gelesen. Das Wort "umfassen" oder Variationen, wie "umfasst" oder "umfassend", werden dementsprechend als implizit verstanden, d.h. beispielsweise, dass angegebene Zahlen einbezogen, aber nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden die hierin verwendeten Begriffe und Ausdrücke als Ausdrücke der Beschreibung und nicht der Begrenzung verwendet, und es gibt keine Absicht solche Begriffe und Ausdrücke, um jegliche Äquivalente der gezeigten und beschriebenen Merkmale oder Teile davon zu begrenzen. D.h. dass verschiedene Modifikationen innerhalb des Schutzzumfangs der beanspruchten Erfindung möglich sind. Somit sollte verstanden werden, dass, obwohl die vorliegende Erfindung durch beispielhafte Ausführungsformen und optionale Merkmale spezifisch offenbart worden ist, Modifikationen und Variationen der Erfindungen, die hierin offenbart sind, von Fachleuten auf dem Feld verwendet werden können, und dass solche Modifikationen und Variationen als innerhalb des Schutzzumfangs dieser Erfindung anzusehen sind.

**[0078]** Der Inhalt aller Dokumente und Patentdokumente, die hierin zitiert sind, wird durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit aufgenommen.

### Bezugszeichenliste

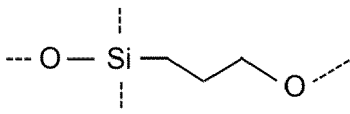
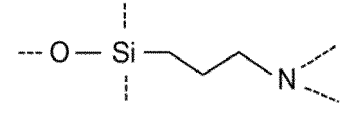
#### [0079]

1	Festphasenfragment
2	Mit biologischem Material beschichtete Oberfläche
3	Dicke
4,5	Kantenlänge
11	Folie
12	Zugspannungseinheit
13	Hebekopfeinheit
14	Entnahmeeinheit
15	Steuereinheit
SIG1, SIG2, SIG3	Steuersignal
R1, R2, R3, R4	Bewegungsrichtung

### Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten, umfassend:

- Bereitstellen eines mit biologischem Material beschichteten Festphasenträgers, wobei der Festphasenträger fragmentiert ist und die Fragmente an einer Folie haften;

- Erzeugen einer Zugspannung an der mit den Festphasenfragmenten beschichteten Folie;  
 - Kontaktieren der Folie mit einem Hebepopf, um ein oder mehrere Festphasenfragmente von der Folie vorzulösen; und  
 - Abnehmen des einen oder der mehreren vorgelösten Festphasenfragmente von der Folie.
2. Das Verfahren nach Anspruch 1, wobei
- (a) die mit biologischem Material beschichtete Oberfläche (2) des Festphasenfragments mindestens 10,25 mm<sup>2</sup>, bevorzugt mindestens 25 mm<sup>2</sup> umfasst;  
 (b) die Länge mindestens einer Kante (4, 5) des Festphasenfragments größer als 3,25 mm, bevorzugt größer als 5 mm ist; und/oder  
 (c) das Festphasenfragment ein Glasfragment ist.
3. Das Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Festphasenfragmentdicke (3) zwischen 0,05 mm und 0,3 mm, bevorzugt zwischen 0,1 mm und 0,2 mm ist.
4. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das biologische Material über ein Linkermolekül an den Festphasenträger gebunden ist.
5. Das Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Linkermolekül
- (a) eine Silicium umfassende Verbindung, bevorzugt ein Silylether ist; oder  
 (b) eine Struktur ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 
- und
- 
- umfasst.
6. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens 70%, bevorzugt mindestens 85% der Oberfläche (2) des Festphasenfragments mit biologischem Material beschichtet ist.
7. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei im Kontaktierungsschritt der Hebepopf die Folie in Richtung der beschichteten Oberfläche (2) des Festphasenfragments drückt.
8. Das Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Drücken durch den Hebepopf die Folie nicht beschädigt, zerreißt oder zersticht.
9. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Zugspannung dadurch erzeugt wird, dass die Folie über einen, bevorzugt kreisförmigen Rahmen gespannt ist.
10. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Abnehmen über eine Entnahmeeinheit mit Saugnapf erfolgt.
11. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Folie eine Klebefolie ist, die
- (a) Polyvinylchlorid (PVC); und/oder  
 (b) Acrykleber
- umfasst.
12. Ein mit biologischem Material beschichtetes Festphasenfragment, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Ein Träger, auf dem mindestens ein Festphasenfragment nach Anspruch 12 aufgebracht ist.
14. Eine Vorrichtung zur Herstellung von mit biologischem Material beschichteten Festphasenfragmenten, umfassend:
- Zug Spannungseinheit ausgebildet zum Erzeugen von Zugspannung an einer Folie;  
 - Hebepopfeneinheit ausgebildet zum Vorlösen von Festphasenfragmenten von einer Folie; und  
 - Entnahmeeinheit ausgebildet zum Abnehmen von Festphasenfragmenten von einer Folie.
15. Die Vorrichtung nach Anspruch 14, ferner umfassend mindestens eine Steuereinheit.

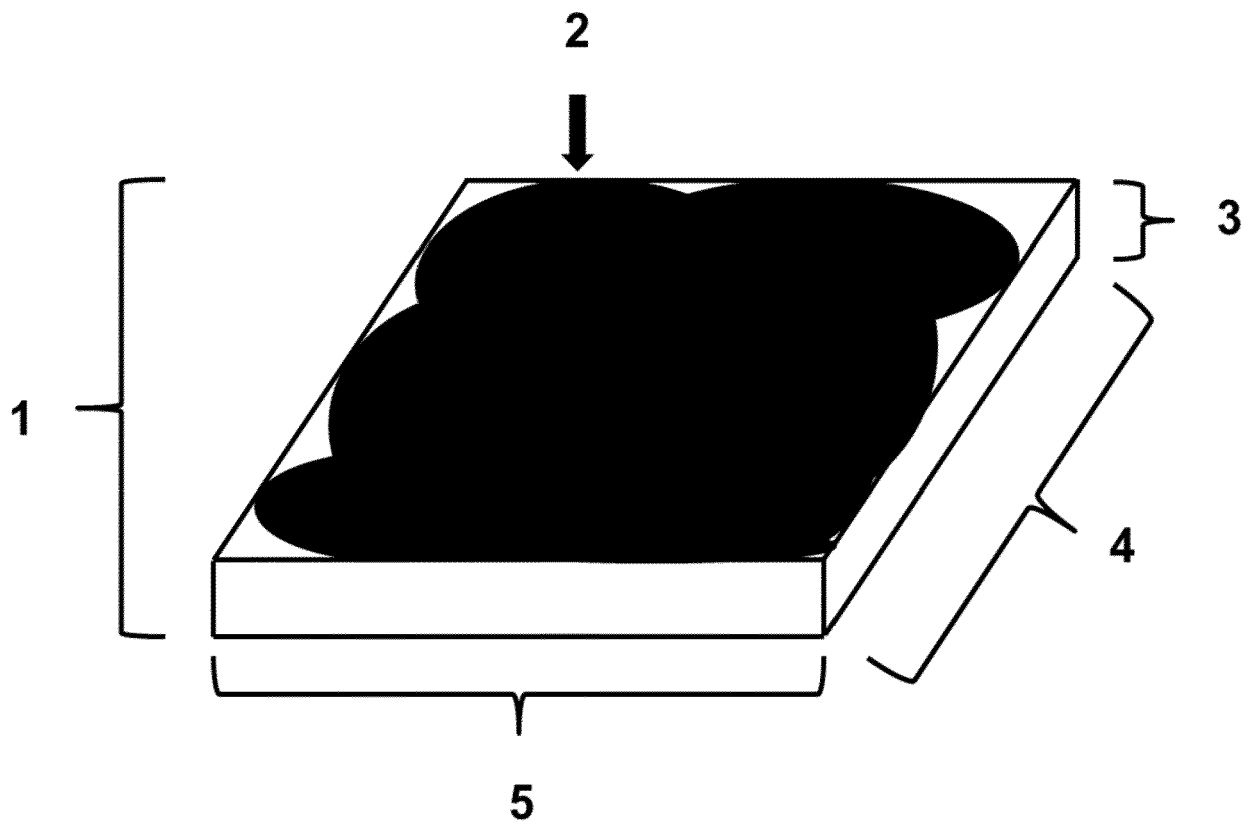


Fig. 1

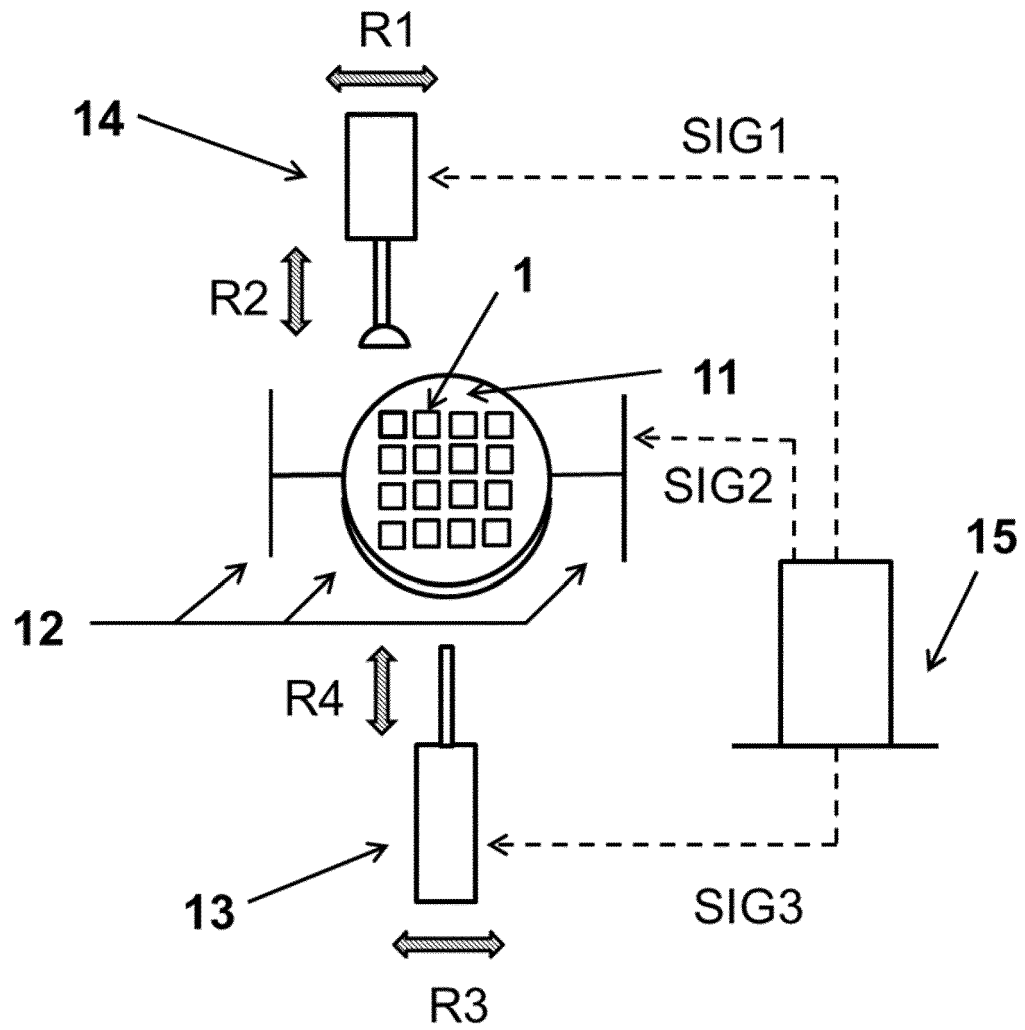


Fig. 2

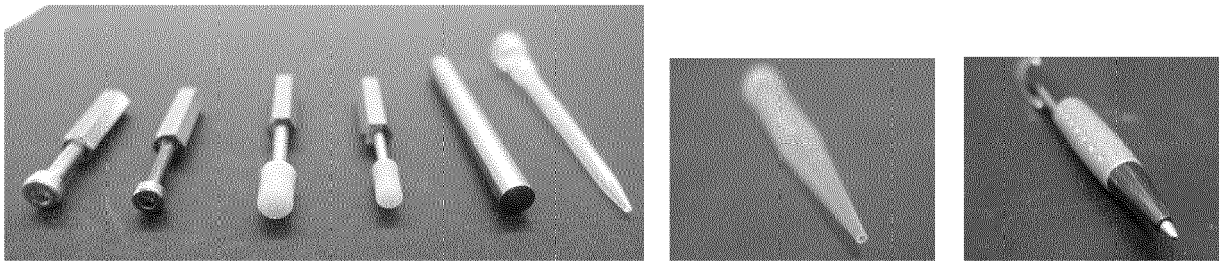
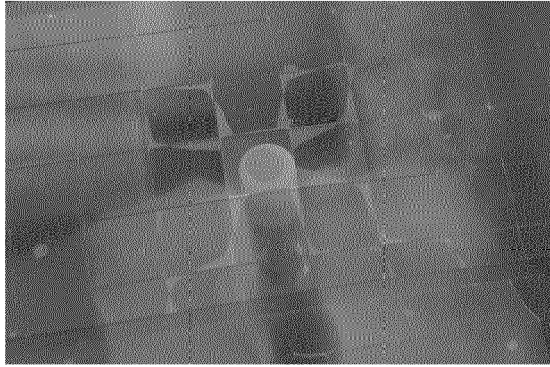
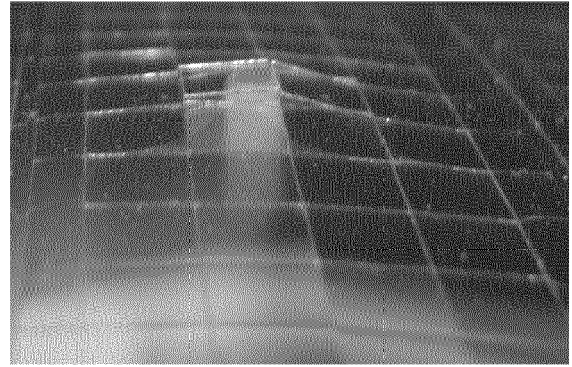


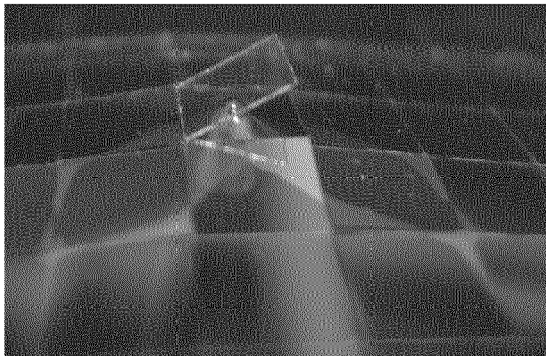
Fig. 3



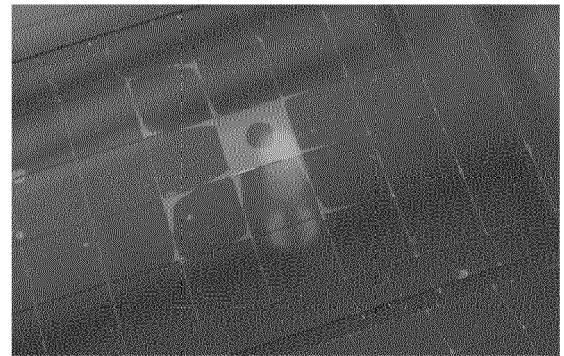
A)



B)



C)



D)

Fig. 4

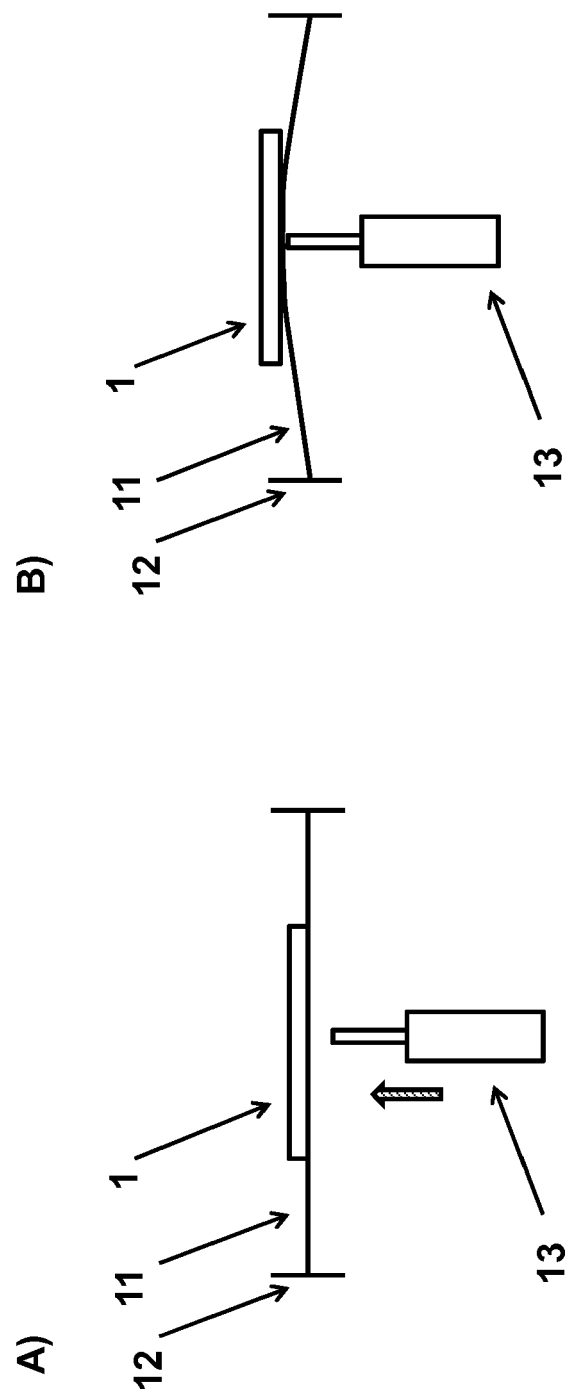


Fig. 5



Folie	maximale Fragmentgröße			
	Verfahren (EP 1718948 B1) (maximale Größe ohne Bruch)		Verfahren (erfindungsgemäß) (maximal getestete Größe)	
	Kantenlänge	Oberfläche	Kantenlänge	Oberfläche
Ultron Systems 1009R	<b>3,2mmx3,2mm</b>	<b>10,24 mm<sup>2</sup></b>	<b>25mmx5,0mm</b>	<b>125 mm<sup>2</sup></b>

Fig. 6



## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

 Nummer der Anmeldung  
 EP 18 18 1192

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	US 4 647 543 A (STOECKER WINFRIED [DE]) 3. März 1987 (1987-03-03) * Abbildung 1 *	12,13	INV. G01N33/543 G01N1/30
X	WO 2005/073693 A1 (EUROIMMUN [DE]; STOCKER WINFRIED [DE]; RATEIKE MARTIN [DE]; MORRIN MAR) 11. August 2005 (2005-08-11) * Ansprüche, S.11 Z.22-23, S.12 Z.14 - S.154 Z.7, insbesondere S.13 Abs.4 *	1-13	
X	WO 2007/140889 A1 (EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDI [DE]; STELLER ULF [DE]; STOECKER WINFRI) 13. Dezember 2007 (2007-12-13) * Abbildung 1 *	12,13	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			G01N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort München		Abschlußdatum der Recherche 2. Oktober 2018	Prüfer Behrens, Ralf
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.92 (P04C03)



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

### GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung Patentansprüche, für die eine Zahlung fällig war.

☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für jene Patentansprüche erstellt, für die keine Zahlung fällig war, sowie für die Patentansprüche, für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden, nämlich Patentansprüche:

☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Patentansprüche erstellt, für die keine Zahlung fällig war.

### MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Siehe Ergänzungsblatt B

☐ Alle weiteren Recherchegebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.

☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Recherchenabteilung nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchegebühren entrichtet worden sind, nämlich Patentansprüche:

☒ Keine der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen, nämlich Patentansprüche:

1-13

☐ Der vorliegende ergänzende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen (Regel 164 (1) EPÜ).



**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT  
DER ERFINDUNG  
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nummer der Anmeldung

EP 18 18 1192

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Ansprüche: 1-13

Verfahren zu Herstellung nach Anspruch 1, sowie das hergestellte Produkt (Ansprüche 12-13).

---

2. Ansprüche: 14, 15

Vorrichtung zur Herstellung nach Anspruch 14.

---

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 18 18 1192

5 In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

02-10-2018

10	Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
15	US 4647543	A	03-03-1987	AT 33717 T		15-05-1988
				DE 3376359 D1		26-05-1988
				EP 0117262 A1		05-09-1984
				JP S59210364 A		29-11-1984
				US 4647543 A		03-03-1987
20	WO 2005073693	A1	11-08-2005	DE 102004005100 A1		25-08-2005
				EP 1718948 A1		08-11-2006
				WO 2005073693 A1		11-08-2005
25	WO 2007140889	A1	13-12-2007	DE 102006027517 A1		13-12-2007
				WO 2007140889 A1		13-12-2007
30						
35						
40						
45						
50						
55						

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente**

- EP 0117262 B1 [0007]
- EP 1718948 B1 [0008] [0045] [0065] [0073] [0074]

**In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur**

- **DAMOISEAUX, J. et al.** *Journal of Immunological Methods, Journal of Immunological Methods*, 2009, vol. 348 (1-2), 67-73 [0065]